

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

J11000 U.S. PTO
09/985689
11/05/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 4月12日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-114048

出 願 人

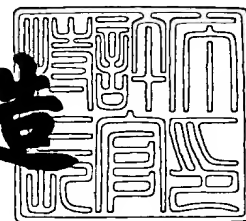
Applicant(s):

花王株式会社

2001年 7月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3064073

【書類名】	特許願
【整理番号】	P01541304
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 9/50 C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	小川 晃範
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	秦田 勇二
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	荒木 裕行
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	佐藤 剛
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	佐伯 勝久
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所 内
【氏名】	影山 泰

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 川合 修次

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100089048

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅野 康隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルカリプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の(a)84位、(b)104位、(c)256位若しくは(d)369位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は下記アミノ酸残基；

(a) 位置：アルギニン残基、

(b) 位置：プロリン残基、

(c) 位置：アラニン、セリン残基、

(d) 位置：アスパラギン残基、

から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ。

【請求項2】 配列番号1に示すアミノ酸配列又はこれと60%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼにおいて、配列番号1の(a)84位、(b)104位、(c)256位若しくは(d)369位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は下記アミノ酸残基；

(a) 位置：アルギニン残基、

(b) 位置：プロリン残基、

(c) 位置：アラニン、セリン残基、

(d) 位置：アスパラギン残基、

から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ。

【請求項3】 配列番号1に示すアミノ酸配列と60%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼが、配列番号2～7から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項2記載のアルカリプロテアーゼ。

【請求項4】 請求項1～3記載のアルカリプロテアーゼをコードする遺伝子。

【請求項5】 請求項4記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

【請求項7】 宿主が微生物である請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか1項記載のアルカリプロテアーゼを

含有する洗剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、洗剤配合用酵素として優れた洗浄性能を有するアルカリプロテアーゼに関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

プロテアーゼは、衣料用洗剤をはじめとする各種洗剤、化粧品、浴用剤、食品改質剤、消化助剤あるいは消炎剤といった医薬品等の多分野で利用されてきた。その中でも最も大量に工業生産され市場規模が大きいのは洗剤用プロテアーゼであり、多くのプロテアーゼが市販されている。

【0003】

ところが、衣料等の汚れは蛋白質だけでなく、脂質、固体粒子など複数の成分が含まれていることが殆どであり、斯かる実際の複合汚れに対して洗浄力の高い洗浄剤が望まれている。このような観点から、本発明者は、高濃度の脂肪酸存在下でもカゼイン分解活性を保持し、蛋白だけでなく皮脂等の汚れのある複合汚れ条件下でも優れた洗浄性を有する分子量約43,000のアルカリプロテアーゼを見出し、先に特許出願した(WO99/18218)。

【0004】

しかし、さらに優れた洗浄性能を有し、幅広い組成の洗剤に適用できるアルカリプロテアーゼが求められていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、変異酵素を中心として前記アルカリプロテアーゼを探索してきたが、従来行なわれているズブチリシンに代表されるセリンプロテアーゼと前記アルカリプロテアーゼとは、酵素学的性質が全く異なり、ズブチリシン等の変異箇所は全く参考にならなかった。そしてさらに検討したところ、前記アルカリプロテアーゼの特性を保持し、洗浄力を向上させるには、ある種のアルカリプロテ

ーアーゼにおいて、当該アミノ酸配列の特定位置に特定のアミノ酸残基が必要であることを見出した。

【 0 0 0 6 】

すなわち本発明は、配列番号 1 の (a) 8 4 位、(b) 1 0 4 位、(c) 2 5 6 位若しくは (d) 3 6 9 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は下記アミノ酸残基；

- (a) 位置：アルギニン残基、
- (b) 位置：プロリン残基、
- (c) 位置：アラニン、セリン残基、
- (d) 位置：アスパラギン残基、

から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、及び該ベクターを含む形質転換体を提供するものである。

【 0 0 0 7 】

また本発明は、このアルカリプロテアーゼを含む洗剤組成物を提供するものである。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】

本発明のアルカリプロテアーゼは、上記のように、配列番号 1 の (a) 8 4 位、(b) 1 0 4 位、(c) 2 5 6 位若しくは (d) 3 6 9 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は下記アミノ酸残基；(a) 位置：アルギニン残基、(b) 位置：プロリン残基、(c) 位置：アラニン、セリン残基、(d) 位置：アスパラギン残基、から選ばれたものである。すなわち、本発明のアルカリプロテアーゼは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼにおける前記 (a) ～ (d) から選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列の当該位置に相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は特定のアミノ酸残基であるプロテアーゼを意味し、これらは野生型、野生型の変異体或いは人為的に変異を施した変異体であってもよい。

【 0 0 0 9 】

ここで、「他種アルカリプロテアーゼ」としては、野生型又は野生型の変異体であってもよく、酸化剤耐性を有し、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000であることが好ましく、配列番号1に示すアミノ酸配列と60%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するものがより好ましい。特に配列番号1に示すアミノ酸配列と60%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するものであって、酸化剤耐性を有し、アルカリ側(pH8以上)で作用し、かつ安定であり、50℃においてもpH10で10分間処理したとき80%以上の残存性を示し、ジイソプロピルフルオルリン酸(DFP)及びフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)で阻害され、SDS-PAGEによる分子量が43,000±2,000のものが好ましい。ここで、酸化剤耐性を有するとは、当該アルカリプロテアーゼを50mM過酸化水素(5mM塩化カルシウムを含有)溶液中で、pH10(20mMグリットンロビンソン緩衝液)で、20℃20分間の残存活性(合成基質法)が少なくとも50%以上を保持していることをいう。

【0010】

ここで、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼ」としては、KP43〔バチルス エスピーKSM-KP43(FERM BP-6532)由来、WO99/18218〕が挙げられ、「配列番号1に示すアミノ酸配列と60%以上の相同性をもつアミノ酸配列を有するアルカリプロテアーゼ」としては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼKP9860〔バチルス エスピーKSM-KP9860(FERM BP-6534)由来、WO99/18218〕、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼE-1〔バチルス No.D-6(FERM P-1592)由来、JP740710〕、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼYa〔バチルス エスピーY(FERM BP-1029)由来、JP861210〕、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼSD521〔バチルス SD521株(FERM P-11162)由来、JP910821〕、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼA-1(NCIB12289由来、WO8801293)、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼA-2(NCIB12513由来、WO8801293)

等が挙げられる。このうち、配列番号2～7から選ばれるアミノ酸配列又はこれと80%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが好ましく、さらにこれと90%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼがより好ましく、特に95%以上の相同性を有するアルカリプロテアーゼが好ましい。

なお、アミノ酸配列の相同性は、リップマン-パーソン (Lipman-Pearson) 法 (Science, 227,1435,1985) によって計算される。

【0011】

また、「相当する位置のアミノ酸残基」を特定する方法としては、例えばリップマン-パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較することにより行うことができる。プロテアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、相当する位置のアミノ酸残基の各プロテアーゼにおける配列中の位置を決めることが可能である。相当する位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象のプロテアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

【0012】

すなわち、(a) 配列番号1の84位のアミノ酸残基はリジン残基であるが、その位置に相当する位置のアミノ酸残基は、上記の方法を用いることにより、例えば配列番号3においてはそれぞれ83位のリジン残基というように特定することができる。

当該アミノ酸残基は、アルギニンであるのが好ましい。

【0013】

(b) 配列番号1の104位のアミノ酸残基はロイシン残基であるが、当該アミノ酸残基又はこれに相当するアミノ酸残基はプロリン残基であるのが好ましい。

【0014】

(c) 配列番号1の256位のアミノ酸残基はメチオニン残基であるが、当該アミノ酸残基は特にアラニンあるいはセリン残基であるのが好ましい。

【0015】

(d) 配列番号1の369位のアミノ酸残基はアスパラギン酸残基であるが、

当該アミノ酸残基又はこれに相当するアミノ酸残基は、アスパラギン残基であるのが好ましい。

【0016】

プロテアーゼK P 4 3のアミノ酸配列（配列番号1）の（a）～（d）位に相当する位置及びアミノ酸残基の具体例を、上記「他種アルカリプロテアーゼ」のうちの好適に用いられるもので示す（表1）。

【0017】

【表1】

変異点	プロテアーゼ						
	TS43	9860	E-1	Ya	SD-521	A-1	A-2
	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号5	配列番号6	配列番号7
(a)	84Lys	84Lys	83Lys	83Lys	83Lys	84Lys	83Lys
(b)	104Leu	104Leu	103Leu	103Leu	103Leu	104Leu	103Leu
(c)	256Met	256Met	255Met	255Met	255Met	256Met	255Met
(d)	369Asp	369Asp	368Asp	368Asp	368Asp	369Asp	368Asp

【0018】

また、本発明アルカリプロテアーゼにおけるアミノ酸残基の欠失又は（a）～（d）の選択は、2個所以上が同時になされていてよい。

【0019】

本発明のアルカリプロテアーゼが変異体である場合、変異を施す前のアルカリプロテアーゼ（親アルカリプロテアーゼということがある）としては、「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するプロテアーゼ」又は上述した「他種アルカリプロテアーゼ」として示したものが該当し、これに目的部位の変異を施すことにより本発明のアルカリプロテアーゼが得られる。例えばプロテアーゼK P 4 3の配列番号1で示されるアミノ酸配列の前記（a）～（d）から選ばれる位置のアミノ酸残基又は他種アルカリプロテアーゼのアミノ酸配列、具体的には配列番号2～7で示されるアミノ酸配列の前記位置に相当する位置のアミノ酸残基を欠失又は他のアミノ酸残基に置換することにより得られる。

【0020】

本発明アルカリプロテアーゼは、例えば以下の方法により得ることができる。
すなわち、クローニングされた親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子に対して変異を与え、得られた変異遺伝子を用いて適当な宿主を形質転換し、当該組換え宿主を培養することにより得られる。親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングは、一般的な遺伝子組換え技術を用いればよく、例えばWO99/18218、JP901128、WO98/56927記載の方法に従って行えばよい。

【0021】

親アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子の変異手段としては、一般的に行われているランダム変異や部異特異的変異の方法がいずれも採用できる。より具体的には、例えば宝酒造社のSite-Directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Kmキット等を用いて行うことができる。また、リコンビナントPCR (polymerase chain reaction) 法 (PCR protocols, Academic press, New York, 1990) を用いることによって、遺伝子の任意の配列を他の遺伝子の該任意の配列に相当する配列と置換することが可能である。

【0022】

得られた変異遺伝子を用いた本発明プロテアーゼの生産方法は、例えば当該変異遺伝子を安定に増幅できるDNAベクターに連結させる、あるいは当該変異遺伝子を安定に維持できる染色体DNA上に導入させるなどの方法で本発明の変異プロテアーゼをコードするDNAを安定に増幅し、さらに該遺伝子を安定にかつ効率よく発現させることが可能である宿主に導入させ、変異プロテアーゼを生産させる方法が採用できる。この条件を満たす宿主としては例えばバチルス属細菌、大腸菌、カビ、酵母、放線菌などが挙げられる。

【0023】

かくして得られる本発明のアルカリプロテアーゼは、アルカリ側で活性を有し、高級脂肪酸によってカゼイン分解活性の阻害を受けず、且つ優れた洗浄力を示すものである。従って、本発明の変異プロテアーゼは、各種洗剤組成物配合用酵素として有用である。

本発明の洗剤組成物中への上記プロテアーゼの含有量は変異プロテアーゼが活

性を示す量であればよく、洗浄組成物1kg当たり0.1～5000P.U.が含まれるが、経済性を考慮し1000P.U.以下、好ましくは500P.U.以下である。

【0024】

本発明の洗剤組成物は、本発明のアルカリプロテアーゼ以外にさまざまな酵素を併用することもできる。例えば、加水分解酵素、酸化酵素、還元酵素、トランスフェラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、シンテターゼ等である。このうち、プロテアーゼ、ケラチナーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、プルラナーゼ、ペクチナーゼ、マンナナーゼ、グルコシダーゼ、グルカナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ及び本発明に用いるアルカリプロテアーゼ以外のプロテアーゼ等が好ましい。

【0025】

プロテアーゼとしては市販のアルカラーゼ、エスペラーゼ、サビナーゼ、エバラーゼ（以上、ノボ ノルディスク社）、プロペラーゼ、プラフェクト（ジェネンコア社）、KAP（花王社）等が挙げられる。セルラーゼとしては、セルザイム、ケアザイム（以上ノボ ノルディスク社）、KAC（花王社）、特開平10-313859号公報記載のバチルス・エスピー KSM-S237株が生産するアルカリセルラーゼ等が挙げられる。アミラーゼとしては、ターマミル、デュラミル（以上、ノボ ノルディスク社）、プラスター（ジェネンコア社）、KAM（花王社）等が挙げられる。リパーゼとしてはリポラーゼ、リポラーゼウルトラ（以上、ノボ ノルディスク社）等が挙げられる。これらの酵素は0.001～10%、好ましくは0.03～5%配合される。

【0026】

界面活性剤は、洗剤組成物中0.5～60重量%（以下単に%で示す）配合され、特に粉体状洗剤組成物については10～45%、液体洗剤組成物については20～50%配合することが好ましい。また本発明洗剤組成物が漂白洗剤又は自動食器洗浄機用洗剤である場合、界面活性剤は一般に1～10%、好ましくは1～5%配合される。

【0027】

二価金属イオン捕捉剤は0.01～50%、好ましくは5～40%配合される。

【0028】

アルカリ剤及び無機塩は0.01～80%、好ましくは1～40%配合される。

【0029】

再汚染防止剤は0.001～10%、好ましくは1～5%配合される。

【0030】

漂白剤（例えば過酸化水素、過炭酸塩等）は1～10%配合するのが好ましい。漂白剤を使用するときは漂白活性化剤（アクチベーター）を0.01～10%配合することができる。

【0031】

蛍光剤はビフェニル型蛍光剤（例えばチノパールCBS-X）やスチルベン型蛍光剤（例えばDM型蛍光染料）等が挙げられる。蛍光剤は0.001～2%配合するのが好ましい。

【0032】

本発明の洗剤組成物は、上記方法で得られるアルカリプロテアーゼ及び上記公知の洗浄成分を組み合わせる常法に従い製造することができる。洗剤の形態は、用途に応じて選択することができ、例えば、液体、粉体、顆粒等に行うことができる。

なお、本発明のアルカリプロテアーゼを粉末洗剤組成物に用いる場合は、洗剤製造時、あるいは使用時に作業員や消費者が酵素との接触をできるだけ避ける目的や、熱による失活あるいは分解を防ぐため特開昭62-257990号公報に記載の方法に基づき製造した顆粒を洗剤粒子製造後に混合することが好ましい。

【0033】

かくして得られる本発明洗剤組成物は、衣料用洗剤、漂白洗剤、自動食器洗浄機用洗剤、配水管洗浄剤、義歯洗浄剤等として使用できるが、特に衣料用洗剤、漂白洗剤、自動食器洗浄機用洗剤として好適に使用することができる。

【0034】

【実施例】

(洗浄力の測定法)

変異酵素の洗浄力評価は、ターゲットメーター（上島製作所製）を用いて行った。市販の衣料用洗剤を所定の使用濃度になるように調製した溶液に、変異酵素を最終濃度で10mPU/L、20mPU/Lになるように添加した。次いで、変異酵素の洗浄力評価に供する汚染布EMPA117（EMPA社製、血液／ミルク／カーボン）を6×6cm画に裁断したものを添加し、特に断らない限り20℃で洗浄（100rpm）を行った。水道水によるすすぎを行った後、色彩色差計（MINOLTA、CM3500d）を用いて明度を測定し、洗浄前後における明度の変化から洗浄率を算出した。

【0035】

(カゼイン分解活性の測定法)

1% (w/v) カゼイン（ハマーStein：メルク社製）を含む50mmol/L ホウ酸-NaOH緩衝液（pH10.5）1mLを30℃で5分間保温した後、0.1mLの酵素溶液を添加し、30℃で15分間反応を行った。TCA溶液（0.1mol/Lトリクロロ酢酸：0.22mol/L酢酸ナトリウム：0.33mol/L酢酸）2mLを添加して反応を停止し、室温で10分間放置した後、酸変性蛋白を濾過（No. 2濾紙：ワットマン社製）した。そして濾液0.5mLにアルカリ性銅試薬（1% (w/v) 酒石酸カリウム・ナトリウム：1% (w/v) 硫酸銅：2% (w/v) 炭酸ナトリウム、0.1mol/L水酸化ナトリウム=1:1:100 (v/v)）2.5mLを添加し、30℃、10分間保温した後、希釈フェノール試薬（フェノール試薬（関東化学社製）をイオン交換水で2倍に希釈したもの）0.25mLを加え、30℃、30分間保温した後、660nmにおける吸光度を測定した。上記の酵素反応系に反応停止液を混合した後、酵素溶液を加えた系をブランクとした。

なお、酵素1単位（P. U.）は、上記の反応条件において1分間に1mmolのチロシンに相当する酸可溶性蛋白分解物を遊離する酵素量とした。

【0036】

実施例1

プロテアーゼ構造遺伝子の終止コドンまでを含む約2.0 kbの範囲に対しランダムに変異を与えることとした。まず、本2.0 kbを増幅できるプライマーを用いPCRを行った。PCR反応液は鋳型DNAを5 ng、リン酸化プライマーを20 pmol、各dNTPを20 nmol、1 μ molのTris/HCl (pH 8.3)、5 μ molのKCl、0.15 μ molのMgCl₂、そして2.5 U Taq DNAポリメラーゼを含有し、最終液量を100 μ Lとした。PCR温度条件は、94℃において5分間放置し鋳型を変性させた後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1.5分間を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。PCR product purification Kit (ベーリンガー社) によってPCR産物を精製し100 μ Lの滅菌水で溶出させた。引き続き、1 μ Lの溶出液を使用して2回目のPCRを行った。PCRの条件は鋳型DNA以外は全て1回目のPCR条件と同じである。2回目のPCR後に1回目と同様にPCR産物を精製し100 μ Lの滅菌水で溶出させた。

【0037】

増幅DNA断片のベクターへの組み込みはTaKaRa社製のLATaqを用いたポリメラーゼ反応による方法によって行った。詳細に説明すると、2回目の精製溶出液35 μ LにLATaq用のバッファー(10倍濃縮液)を5 μ L、dNTP溶液を8 μ L、LATaq DNAポリメラーゼを0.5 μ L、さらに鋳型としてプラスミドpHA64TS(発現ベクターpHA64にプロテアーゼ構造遺伝子を連結)を20 ng添加後、最終液量を50 μ Lにし、94℃1分間、55℃1分間、72℃4分間を30サイクルの条件でPCR反応を行った。その後エタノール沈澱によってPCR産物を回収した。このPCR産物はプライマー位置の5'側にニックを有するプラスミドの形状を成しており、このニック部分を連結させるために、さらにT4リガーゼ(TaKaRa社)によるリガーゼ反応処理を行った。

【0038】

次に、同リガーゼ反応液10 μ Lを用いてBacillus subtilis ISW1214株の形質転換を行ったところ約 4×10^5 個の形質転換体が取得された。そこでISW1214株の形質転換体をスキムミルク含有培地(スキムミルク1%、バクトトリプトン1%、塩化ナトリウム1%、酵母エキス0.5%、寒天1.5%

、テトラサイクリン7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 上に生育させ、プロテアーゼ分泌量を反映していると考えられるハローの形成状態を観察した。

【0039】

実施例2

実施例1で得られた変異プロテアーゼの洗浄力の測定結果を図1に示す。本発明の変異アルカリプロテアーゼはいずれも変異を導入する前の野生型酵素に比べて優れた洗浄力を有していた。

【0040】

実施例3

(1) 粒状洗剤の調製

WO99/29830号公報の実施例3に記載の洗剤を用いて洗浄力評価を行った。即ち攪拌翼を有した1 m^3 の混合槽に水465kgを加え、水温が55℃に達した後に、50% (w/v) ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液48kg、40% (w/v) ポリアクリル酸ナトリウム水溶液135kgを添加した。15分間攪拌した後、炭酸ナトリウム120kg、硫酸ナトリウム60kg、亜硫酸ナトリウム9kg、蛍光染料3kgを添加した。更に15分間攪拌した後、ゼオライト300kgを添加し、30分間攪拌して均質なスラリーを得た(スラリー中の水分は50重量%)。このスラリーを噴霧乾燥塔の塔頂付近に設置した圧力噴射ノズルから噴霧することでベース顆粒を得た(噴霧乾燥塔に供給する高温ガスは塔下部より温度が225℃で供給し、塔頂より105℃で排出)。

次に非イオン界面活性剤15重量部と50重量%のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液15重量部とポリエチレングリコール1重量部を70℃になるように加熱混合し、混合液を作製した。レディゲミキサー(松坂技研(株)製、容量20L、ジャケット付)に上記ベース顆粒100重量部を投入し、主軸(150rpm)とチョッパー(4000rpm)の攪拌を開始した。なお、ジャケットに75℃の温水を10L/分で流し、そこに上記混合液を3分間で投入し、その後5分間攪拌を行った。更にこの洗剤粒子群の粒子表面に結晶性アルミノ珪酸塩10重量部で表面被覆を行い、最終粒状洗剤を得た。

[使用した原料]

ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液：ネオペレックスF65（花王（株）製）

非イオン界面活性剤：エチレンオキサイド平均付加モル数が8.5のエマルゲン108KM（花王（株）製）

ポリアクリル酸ナトリウム水溶液：平均分子量10000（特公平2-24283号公報の実施例に記載の方法に従って製造した）

炭酸ナトリウム：デンス灰（セントラル硝子（株）製）

ゼオライト：平均粒径が3.5μmのゼオライト4A型（東ソー（株）製）

ポリエチレングリコール：K-PEG6000（平均分子量8500（花王（株）製）

蛍光染料：チノパールCBS-X（チバガイギー社製）

【0041】

（2）プロテアーゼ造粒物の調製

本発明のアルカリプロテアーゼ及び親アルカリプロテアーゼの精製標品から特開昭62-257990号公報に記載の方法に基づきプロテアーゼ造粒物を調製した（6P. U. / g）。

【0042】

（3）洗浄力の測定

20℃に温度調節した1Lのカルシウム水溶液（71.2mg炭酸カルシウム／1L）に表2に示す洗剤組成物を0.67g溶解した。試験布（EMPA117（EMPA社製、血液／ミルク／カーボン））を6×6cmに裁断後、Terg-O-tometer（上島製作所製）を使用し、20℃、100rpmで10分間洗浄を行った。濯ぎ、乾燥後、色彩色差計（MINOLTA、CM3500d）を用いて明度を測定し、下式より洗浄率を算出した。結果を表2に併せて示す。

【0043】

【数1】

$$\text{洗浄率 (\%)} = \frac{\text{洗浄後の試験布の明度} - \text{洗浄前の試験布の明度}}{\text{汚染前の試験布の明度} - \text{洗浄前の試験布の明度}} \times 100$$

【0044】

【表2】

			本発明品					比較品	
			1	2	3	4	5	1	2
重量部	本発明アルカリプロ テアーゼ造粒物	K 8 4 R	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		
		L 1 0 4 P							
		M 2 5 6 S							
		M 2 5 6 A							
		D 3 6 9 N							
	親アルカリプロテアーゼ造粒物							0.5	
	粒状洗剤		99.5						100
洗浄率 (%)			38	38	36	36	34	31	23

【0045】

【発明の効果】

本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、かつ洗浄力が高く、洗剤配合用酵素として有用なアルカリプロテアーゼを提供できる。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Alkaline protease

<130> P01541304

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 1

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly

65 70 75 80

Ser Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130 135 140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala
145 150 155 160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala
165 170 175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe
180 185 190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg
195 200 205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly
210 215 220

Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe
225 230 235 240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met
245 250 255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe
260 265 270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala
275 280 285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr

305

310

315

320

Val Asn Glu Ser Ser Ser Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Gln Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ser Pro Tyr Asn Asp Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 2

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

Thr Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly

65 70 75 80

Ala Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

85 90 95

Ile Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Gln

100 105 110

Thr Leu Phe Ser Gln Ala Phe Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn

115 120 125

Ser Trp Gly Ala Ala Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn

130

135

140

Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala

145

150

155

160

Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala

165

170

175

Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe

180

185

190

Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg

195

200

205

Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly

210

215

220

Thr Tyr Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe

225

230

235

240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Val Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asn
290 295 300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr
305 310 315 320

Val Asn Glu Ser Ser Ala Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Thr
325 330 335

Phe Thr Ala Thr Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser
340 345 350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Thr Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu
355 360 365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Arg Tyr Val Gly Asn Asp
370 375 380

Phe Ser Ala Pro Phe Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu
385 390 395 400

Asn Val Phe Ile Asn Ser Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val
405 410 415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Val Gly Pro Gln Asn Phe Ser Leu Ala Ile
420 425 430

Val Asn

<210> 3

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 3

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1 5 10 15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20 25 30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50 55 60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65 70 75 80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85 90 95

Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100 105 110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115	120	125
Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val		
130	135	140
Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly		
145	150	155
		160
Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys		
165	170	175
Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly		
180	185	190
Ser Ile Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly		
195	200	205
Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr		
210	215	220
Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp		
225	230	235
		240
Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala		
245	250	255
Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile		
260	265	270

Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu

275

280

285

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asp Gln

290

295

300

Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val

305

310

315

320

Asn Glu Ala Thr Ala Leu Thr Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe

325

330

335

Gln Thr Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp

340

345

350

Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp

355

360

365

Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe

370

375

380

Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn

385

390

395

400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln

405

410

415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val

420

425

430

His

<210> 4

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 4

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Ser Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65

70

75

80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95

Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val

130

135

140

Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Ile Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225

230

235

240

Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala

245

250

255

Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile

260	265	270
Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu		
275	280	285
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Asn Gly Asp Gln		
290	295	300
Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asn Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val		
305	310	315 320
Asn Glu Ala Thr Ala Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe		
325	330	335
Gln Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp		
340	345	350
Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp		
355	360	365
Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe		
370	375	380
Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn		
385	390	395 400
Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Ile Ile Glu Val Gln		
405	410	415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val

420

425

430

His

<210> 5

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 5

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65

70

75

80

Leu Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95

Met Asp Ser Ser Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Leu Asn Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Trp Asn Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Asn Ser Arg Gln Val

130

135

140

Asp Glu Tyr Val Arg Asn Asn Asp Met Thr Val Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Asn Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Tyr Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Leu Ala Asp Asn Pro Asn His Ile Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Ala Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Thr Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225

230

235

240

Ala Asn Tyr Asn Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala

245

250

255

Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Ile

260

265

270

Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Ile Lys Ala Ala Leu

275

280

285

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Val Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asp Gln

290

295

300

Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Tyr Val

305

310

315

320

Asn Glu Ala Thr Ala Leu Ala Thr Gly Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe

325

330

335

Gln Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Thr Asp

340

345

350

Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Tyr Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp

355

360

365

Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Gln Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe

370

375

380

Ser Tyr Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn

385

390

395

400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Val Gln

405

410

415

Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu Ala Ile Val

420

425

430

His

<210> 6

<211> 434

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 6

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Ser Ser

1

5

10

15

Tyr Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Val Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Gly

65

70

75

80

Thr Ser Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser

	85	90	95
Val Met Asp Ser Asn Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ser Asn Val Ser			
	100	105	110
Thr Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn			
	115	120	125
Ser Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn			
	130	135	140
Val Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Ala Val Leu Phe Ala Ala			
	145	150	155
			160
Gly Asn Glu Gly Pro Asn Gly Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala			
	165	170	175
Lys Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe			
	180	185	190
Gly Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg			
	195	200	205
Gly Pro Thr Lys Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly			
	210	215	220
Thr Phe Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe			
	225	230	235
			240

Trp Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met

245

250

255

Ala Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe

260

265

270

Ile Lys Asn Arg Gly Ile Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala

275

280

285

Leu Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Ser Gly Asn

290

295

300

Gln Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Phe

305

310

315

320

Val Asn Glu Thr Ser Ser Leu Ser Thr Asn Gln Lys Ala Thr Tyr Ser

325

330

335

Phe Thr Ala Gln Ser Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser

340

345

350

Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ala Ser Val Thr Leu Val Asn Asp Leu

355

360

365

Asp Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Lys Tyr Val Gly Asn Asp

370

375

380

Phe Thr Ala Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu

385

390

395

400

Asn Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Val Glu Val

405

410

415

Gln Ala Tyr Asn Val Pro Gln Gly Pro Gln Ala Phe Ser Leu Ala Ile

420

425

430

Val Asn

<210> 7

<211> 433

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 7

Asn Asp Val Ala Arg Gly Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gln Asn Asn

1

5

10

15

Phe Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Gln Ile Val Ala Val Ala Asp Thr Gly

20

25

30

Leu Asp Thr Gly Arg Asn Asp Ser Ser Met His Glu Ala Phe Arg Gly

35

40

45

Lys Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Leu Gly Arg Thr Asn Asn Ala Asn Asp

50

55

60

Pro Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Leu Gly Asn Ala

65

70

75

80

Thr Asn Lys Gly Met Ala Pro Gln Ala Asn Leu Val Phe Gln Ser Ile

85

90

95

Met Asp Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gly Leu Pro Ala Asn Leu Gln Thr

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Ala Tyr Ser Ala Gly Ala Arg Ile His Thr Asn Ser

115

120

125

Trp Gly Ala Pro Val Asn Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Ser Arg Asn Val

130

135

140

Asp Asp Tyr Val Arg Lys Asn Asp Met Thr Ile Leu Phe Ala Ala Gly

145

150

155

160

Asn Glu Gly Pro Gly Ser Gly Thr Ile Ser Ala Pro Gly Thr Ala Lys

165

170

175

Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Thr Glu Asn Leu Arg Pro Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Tyr Ala Asp Asn Ile Asn His Val Ala Gln Phe Ser Ser Arg Gly

195

200

205

Pro Thr Arg Asp Gly Arg Ile Lys Pro Asp Val Met Ala Pro Gly Thr

210

215

220

Tyr Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Ala Pro Asp Ser Ser Phe Trp

225	230	235	240
Ala Asn His Asp Ser Lys Tyr Ala Tyr Met Gly Gly Thr Ser Met Ala			
245	250	255	
Thr Pro Ile Val Ala Gly Asn Val Ala Gln Leu Arg Glu His Phe Val			
260	265	270	
Lys Asn Arg Gly Val Thr Pro Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala Ala Leu			
275	280	285	
Ile Ala Gly Ala Ala Asp Val Gly Leu Gly Phe Pro Asn Gly Asn Gln			
290	295	300	
Gly Trp Gly Arg Val Thr Leu Asp Lys Ser Leu Asn Val Ala Phe Val			
305	310	315	320
Asn Glu Thr Ser Pro Leu Ser Thr Ser Gln Lys Ala Thr Tyr Ser Phe			
325	330	335	
Thr Ala Gln Ala Gly Lys Pro Leu Lys Ile Ser Leu Val Trp Ser Asp			
340	345	350	
Ala Pro Gly Ser Thr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Val Asn Asp Leu Asp			
355	360	365	
Leu Val Ile Thr Ala Pro Asn Gly Thr Lys Tyr Val Gly Asn Asp Phe			
370	375	380	

Thr Ala Pro Tyr Asp Asn Asn Trp Asp Gly Arg Asn Asn Val Glu Asn
 385 390 395 400

Val Phe Ile Asn Ala Pro Gln Ser Gly Thr Tyr Thr Val Glu Val Gln
 405 410 415

Ala Tyr Asn Val Pro Val Ser Pro Gln Thr Phe Ser Leu Ala Ile Val
 420 425 430

His

【図面の簡単な説明】

【図 1】

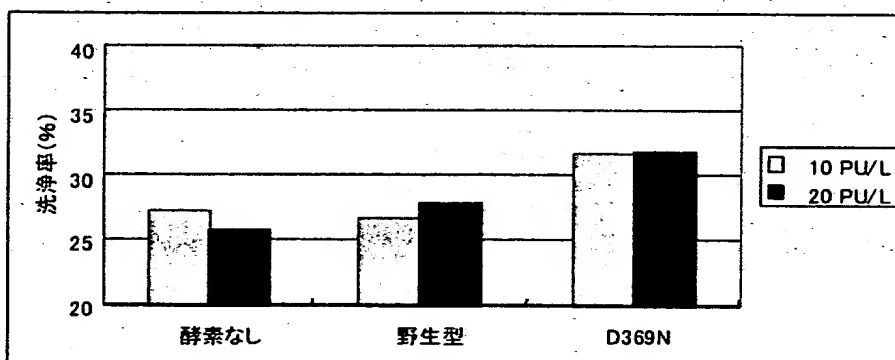
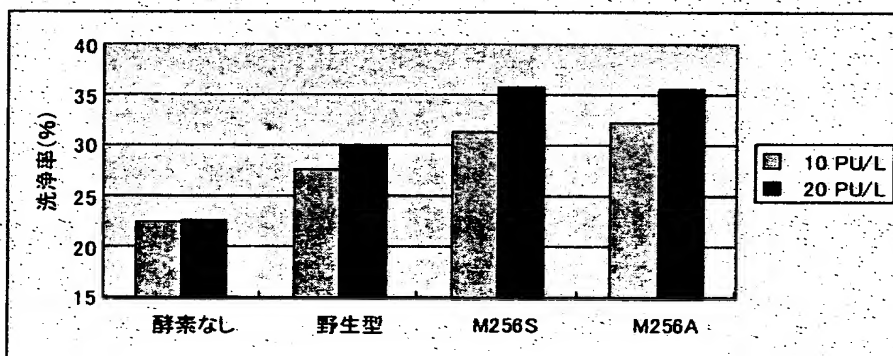
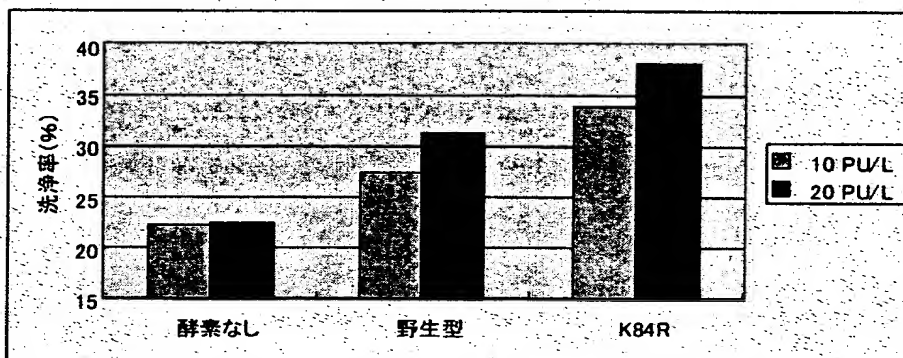
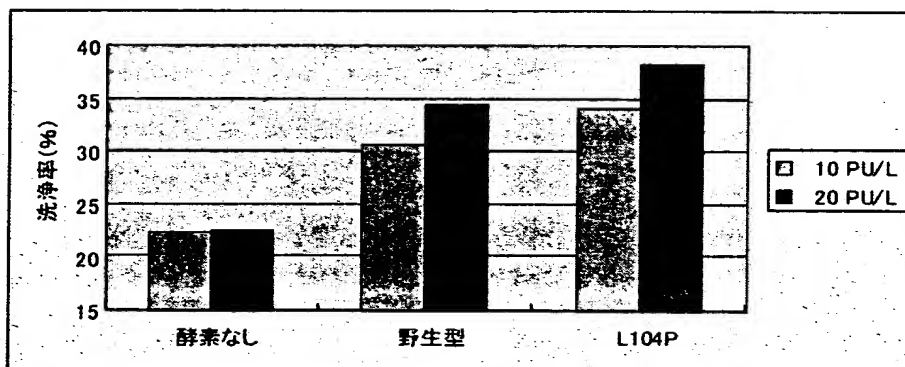
各変異アルカリプロテアーゼの洗浄力を示す図である。

特 2 0 0 1 - 1 1 4 0 4 8

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 配列番号 1 の (a) 84 位、(b) 104 位、(c) 256 位若しくは (d) 369 位又はこれに相当する位置のアミノ酸残基が欠失又は下記アミノ酸残基；(a) 位置：アルギニン残基、(b) 位置：プロリン残基、(c) 位置：アラニン、セリン残基、(d) 位置：アスパラギン残基、から選ばれたものであるアルカリプロテアーゼ、該アルカリプロテアーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターを含有する形質転換体、該アルカリプロテアーゼを含有する洗剤組成物。

【効果】 本発明によれば、高濃度の脂肪酸存在下でも活性を有し、かつ洗浄力が高く、洗剤配合用酵素として有用なアルカリプロテアーゼを提供できる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 1 1 4 0 4 8
受付番号	5 0 1 0 0 5 4 0 8 1 9
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 3 年 4 月 1 3 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 4月12日
-------	-------------

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [000000918]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
氏 名 花王株式会社